SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 2332.9:2011

Cara uji mikrobiologi – Bagian 9: Penentuan *Staphylococcus aureus* pada produk perikanan

ICS 67.050

Badan Standardisasi Nasional

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Penentuan *Staphylococcus aureus* dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar 2
4 Penentuan *Staphylococcus aureus* dengan metode Angka Paling Memungkinkan (APM) 8
5 Keamanan dan keselamatan kerja 11
Lampiran A (normatif) Angka Paling Memungkinkan / APM dengan seri tabung pengenceran 13
Lampiran B (normatif) Pembuatan media 15
Lampiran C (normatif) Pembuatan pereaksi 17
Bibliogafi 19

Gambar 1 - Tipe reaksi uji koagulase 6

Tabel 1 - Karakteristik yang khas dari *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* dan *Micrococci* 5
Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95 % untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3} 14

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan di luar negeri, maka maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metoda uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari SNI 01-2338-1991, yang disusun oleh Panitia Teknis 65-05 Produk Perikanan dalam rangka perbaikan setelah 5 (lima) tahun yang telah dirumuskan melalui rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 25 Maret 2009 di Jakarta, dihadiri oleh wakil-wakil produsen, konsumen, asosiasi, lembaga penelitian, perguruan tinggi serta instansi terkait sebagai untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan Standar Nasional Indonesia ini, maka aturan-aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah:

1. Undang-Undang No.7 tahun 1996 tentang Pangan.
2. Undang-Undang No.8 tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
3. Undang-Undang No.31 tahun 2004 tentang Perikanan dan amandemen Undang-undang No 45 tahun 2009.
4. Peraturan Pemerintah No.69 tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
5. Peraturan Pemerintah No. 82 tahun 2001 tentang Pengelolaan Kualitas Air dan Pengendalian Pencemaran Air.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. PERMEN 01/MEN/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
8. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP. 06/MEN/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
9. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan No. KEP. 01/MEN/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2010 sampai dengan 22 Mei 2010 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

Cara uji mikrobiologi – Bagian 9: Penentuan *Staphylococcus aureus* pada poduk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan metode penentuan *Staphylococcus aureus* pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1
inkubasi
pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan media, suhu dan waktu yang diperlukan

2.2
uji koagulase
uji yang digunakan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari koagulase negatif staphylococci

2.3
koloni
mikroorganisme yang tumbuh pada media biakan padat yang dapat dilihat secara visual

2.4
metode Angka Paling Memungkinkan /APM
metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi, menggunakan 3 seri tabung dan atau perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik

2.5
metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar
metode yang menggunakan media agar steril yang dituangkan ke dalam cawan Petri steril dan dibiarkan membeku, kemudian contoh disebar diatas permukaan media agar tersebut

2.6
mikroorganisme
organisme yang berukuran kecil dan hanya dapat dilihat dibawah mikroskop

2.7
produk perikanan
ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan / atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

2.8
Staphylococcus aureus
bakteri Gram positif dengan diameter 0,5 μm–1,0 μm, berbentuk seperti rangkaian buah anggur, tidak membentuk spora dan tidak bergerak

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

3 Penentuan *Staphylococcus aureus* dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar

3.1 Prinsip

Metode cawan hitung agar sebar dengan cara menuangkan media *Baird Parker Agar* ke dalam cawan Petri steril, biarkan membeku, kemudian contoh sebanyak 1 ml disebar diatas permukaan media. Konfirmasi koloni terduga *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan uji koagulase dan uji tambahan. Metode ini sesuai untuk menganalisis makanan yang diduga mengandung koloni lebih dari 100 *Staphylococcus aureus*/g.

3.2 Peralatan

a) *Autoclave*;
b) Alat penghitung koloni;
c) Alat timbang analitik dengan ketelitian ± 0,000 1 g;
d) Alat timbang dengan ketelitian ± 0,1 g;
e) Botol pengencer 20 ml;
f) Blender beserta Jar yang dapat disterilisasi atau stomacher;
g) Batang gelas bengkok diameter 3 mm – 4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm – 20 cm;
h) Cawan Petri 15 mm x 90 mm;
i) Gelas ukur 250 ml;
j) Gelas preparat;
k) Inkubator (35 ± 1) °C;
l) Membran aparatus;
m) Membran filter;
n) Pipet gelas atau pipetor 0,1 ml dan 1 ml;
o) Pipet pasteur;
p) *Waterbath*.

3.3 Media dan pereaksi (Lampiran B dan C)

a) *Baird Parker Agar* (B.1);
b) *Brain Heart Infusion Broth* (B.2);
c) *Coagulase Plasma* (*Rabbit*) dengan EDTA;
d) Larutan *Butterfield's phosphate buffered* (C.1);
e) *Parafin oil* steril;
f) Pereaksi katalase (3% H_2O_2) (C.2);
g) Pereaksi pewarnaan gram (C.3);
h) *Purple Carbohydrate Broth* (masing-masing mengandung *glucose* dan *manitol* 0,5%) (B.3);
i) *Toluidine Blue* - DNA Agar (B.4);
j) *Trypticase* (*Tryptic*) *Soy* Agar (B.5).

3.4 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknik aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau laminar *air flow* yang kontaminasinya terkontrol. Media *Baird Parker Agar* yang akan digunakan harus dalam keadaan kering. Bila koloni *Staphylococcus aureus* belum tumbuh dengan baik setelah 48 jam, inkubasi dapat dilanjutkan sampai 72 jam.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

3.5 Preparasi contoh

Berat contoh yang akan diuji diambil dengan ketentuan sebagai berikut:

3.5.1 Contoh dengan berat kurang dari 1 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil-kecil hingga beratnya mencapai 100 g.

3.5.2 Contoh dengan berat antara 1 kg – 4,5 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 300 g.

3.5.3 Contoh dengan berat lebih dari 4,5 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil kecil hingga beratnya mencapai 500 g.

CATATAN 1 Contoh beku dilelehkan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C – 5 °C atau suhu dan waktu maksimal 45 °C dan 15 menit.

3.6 Prosedur

Timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh dengan ketentuan 3.5.1 dan 3.5.2 dan 50 g untuk contoh dengan ketentuan 3.5.3, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril. Untuk contoh 25 g tambahkan 225 ml larutan *butterfield's phosphate buffered* dan untuk contoh 50 g tambahkan 450 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*, homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^1. Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 ml homogenat dan masukkan ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered* untuk mendapatkan pengenceran 10^2. Siapkan pengenceran selanjutnya (10^3) dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran 10^2 ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^4, 10^5, dan seterusnya sesuai kondisi contoh.

3.6.1 Isolasi *Staphylococcus aureus*

a) Secara aseptis pindahkan 1 ml dari setiap pengenceran 10^1,10^2, dst. masukkan dalam 3 cawan masing masing (0,4 ml; 0,3 ml; 0,3 ml) yang sudah berisi media *Baird Parker Agar*.
b) Ratakan inokulum pada permukaan agar dengan menggunakan batang gelas bengkok dan biarkan inokulum sampai terserap ke dalam media kira kira 10 menit dalam media *Baird Parker Agar* kering. Bila inokulum belum terserap, letakkan cawan dalam inkubator dengan posisi menghadap ke atas sekitar 1 jam. Balik cawan Petri dan inkubasi selama 45 jam - 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
c) Koloni *Staphylococcus aureus* pada *Baird Parker Agar* mempunyai ciri-ciri: koloni bundar, licin/halus, cembung, diameter 2 mm - 3 mm, warna abu - abu hingga kehitaman, sekeliling tepi koloni bening (terbentuk *halo*). Koloni-koloni mempunyai konsistensi berlemak dan lengket bila diambil dengan jarum inokulasi.

CATATAN 2 *Strains* yang berasal dari makanan beku atau makanan kering yang sudah lama disimpan, sering memberikan warna yang kurang hitam dibandingkan dengan koloni yang khas *Staphylococcus aureus*. Selain itu kenampakan koloni juga kasar dan teksturnya kering.

3.6.2 Perhitungan koloni

a) Pilih cawan Petri yang mempunyai jumlah koloni 20 - 200. Hitung dan catat jumlah koloni.
b) Bila terdapat beberapa jenis koloni yang terlihat seperti *Staphylococcus aureus* pada cawan Petri, hitung masing-masing jenis tersebut dan catat hasil perhitungannya secara terpisah.
c) Jika cawan Petri pada pengenceran terendah berisi kurang dari 20 koloni, data koloni dapat digunakan.
d) Bila terdapat cawan yang berisi lebih dari 200 koloni dengan ciri-ciri *Staphylococcus aureus* dan pada pengenceran yang lebih tinggi tidak ditemukan koloni, maka gunakan cawan tersebut untuk menghitung *Staphylococcus aureus*.
e) Ambil 2 atau lebih koloni terduga untuk uji koagulase dan uji tambahan.

3.6.3 Uji koagulase

a) Inokulasi koloni terduga *Staphylococcus aureus* ke dalam 2 ml BHI broth dan inkubasi 18 jam – 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
b) Pindahkan 0,2 ml - 0,3 ml inokulum tersebut ke dalam tabung steril dan tambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian aduk. Inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C. Amati tiap jam untuk 4 jam pertama dan lanjutkan hingga 24 jam untuk melihat terbentuknya koagulan.
c) Koagulan yang terbentuk secara padat/solid dan tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif (reaksi 4+) *Staphylococcus aureus*. Koagulan yang menunjukkan reaksi 2+ dan 3+ harus dilakukan uji tambahan. Tipe reaksi uji koagulase dapat dilihat pada Gambar 1.

3.6.4 Uji tambahan

3.6.4.1 Uji katalase

a) Ambil 1 ose inokulum dari BHI broth (3.6.3.a) goreskan ke dalam media TSA miring dan inkubasi selama 18 jam – 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
b) Setelah diinkubasi ambil 1 ose inokulum tersebut dan letakkan diatas gelas preparat, tetesi dengan H_2O_2 untuk melihat pembentukan gelembung-gelembung gas.

3.6.4.2 Fermentasi glukosa secara anaerob

a) Ambil 1 ose inokulum dari BHI broth (3.6.3.a). Inokulasikan ke tabung reaksi yang berisi media karbohidrat mengandung 0,5 % glukosa, tutup lapisan atas dengan paraffin oil steril setebal 25 mm.
b) Inkubasi selama 5 hari pada suhu (35 ± 1) °C. Kondisi asam dihasilkan secara anaerob jika terjadi perubahan warna media dari ungu menjadi kuning, ini menunjukkan adanya *Staphylococcus aureus*.

3.6.4.3 Fermentasi manitol secara anaerob

Lakukan seperti no. 3.6.4.2 di atas. Gunakan manitol sebagai karbohidrat dalam media. *Staphylococcus aureus* biasanya memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna dari ungu ke kuning, tetapi beberapa strain memberikan hasil negatif.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

3.6.4.4 Uji produksi nuklease thermostabil

Uji produksi nuklease thermostabil tidak dapat menggantikan uji koagulase tetapi hanya digunakan untuk mendukung pengujian yang memberikan reaksi koagulase 2+. Pada uji ini terjadi perubahan warna dari biru menjadi merah muda cerah.

a) Tuang 3 ml *toluidine blue*–DNA agar diatas permukaan gelas preparat. Setelah media agar tersebut membeku, lubangi dengan diameter 2 mm.
b) Ambil 0,01 ml kultur BHI broth (3.6.3a) yang telah dipanaskan dalam *waterbath* mendidih pada suhu 100 °C selama 15 menit
c) Letakkan gelas preparat pada kondisi yang lembab dan inkubasi selama 4 jam pada suhu (35 ± 1) °C. Apabila terbentuk lingkaran berwarna merah muda cerah di sekeliling lubang sekurang-kurangnya 1 mm, menunjukkan reaksi positif.

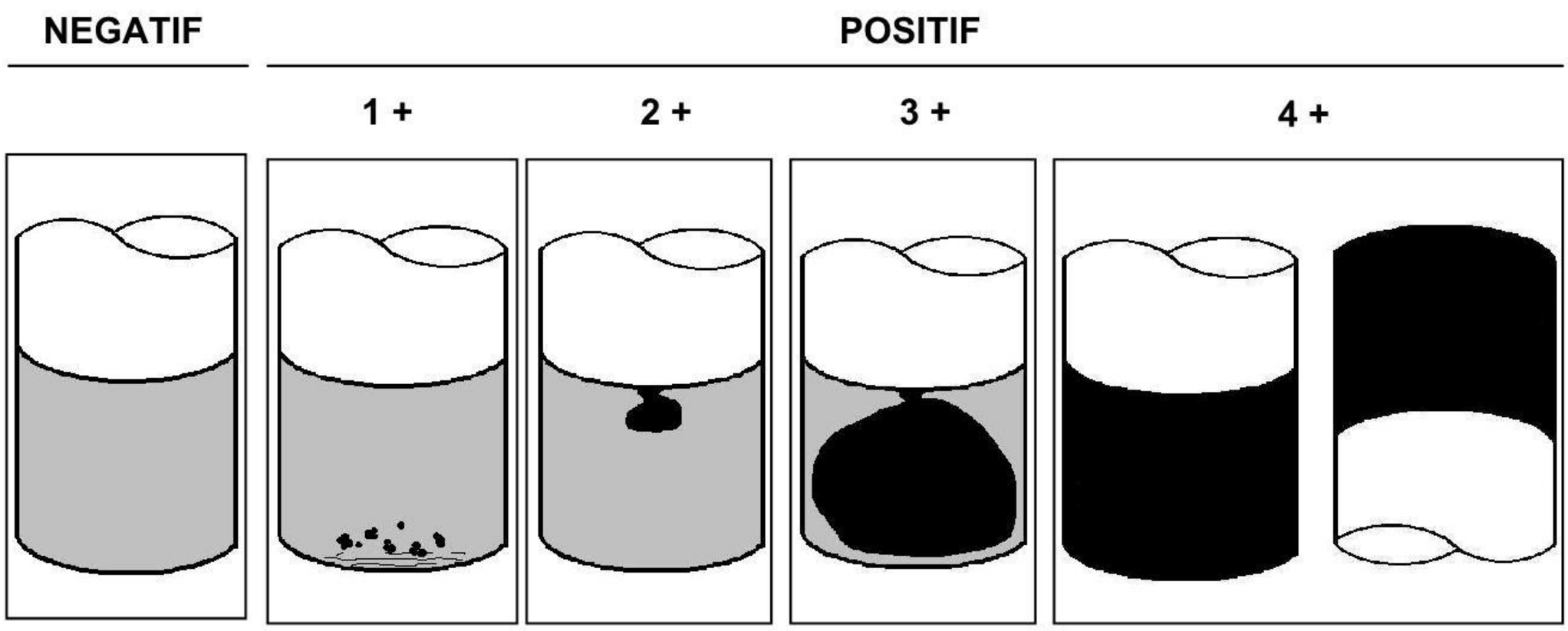
Karakteristik *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 - Karakteristik yang khas dari *Staphylococcus aureus, S. epidermidis* dan *Micrococci*

Karakteristik		S. aureus	S. epidermidis	Micrococci (a)
1	Uji katalase	+	+	+
2	Uji koagulase	+	-	-
3	Uji produksi nuklease thermostabil	+	+	-
4	Fermentasi secara anaerob:			
	- glukosa	+	+	-
	- manitol	+	-	-

CATATAN [a] **+**, Mayoritas (90 % atau lebih) *strains* adalah positif; –, mayoritas (90 % atau lebih) *strains* adalah negatif

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"



Negatif : Jika koagulan tidak terbentuk.
1 + Positif : Jika koagulan tidak terkumpul dan sedikit.
2 + Positif : Jika koagulan terkumpul dibagian atas dan sedikit.
3 + Positif : Jika koagulan terkumpul dibagian bawah dan banyak.
4 + Positif : Jika koagulan pada tabung dibalik tidak jatuh.

Gambar 1 - Tipe reaksi uji koagulase

3.6.5 Pelaporan *Staphylococcus aureus* dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar

Dari setiap pengenceran, jumlahkan koloni - koloni pada ketiga cawan Petri yang memberikan hasil koagulase atau uji tambahan positif kemudian kalikan dengan faktor pengencerannya.

Laporkan hasilnya sebagai jumlah *Staphylococcus aureus* per gram produk

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.

- Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi, bila angka ketiga adalah 6, 7, 8 atau 9 maka gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.

- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah 1, 2, 3 atau 4. Bila angka ketiga 5, bulatkan keatas bila angka kedua ganjil dan bulatkan kebawah bila angka kedua itu genap.

CONTOH 1

Hasil perhitungan		*Staphylococcus aureus*
12.700	menjadi	13.000
12.400	menjadi	12.000
15.500	menjadi	16.000
14.500	menjadi	14.000

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Skema penentuan *Staphylococcus aureus* dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar

HOMOGENISASI :

25 gr/25 ml contoh dalam 225 ml BFP
atau
50 g/50 ml contoh dalam 450 ml BFP

1 ml

1 ml

9 ml BFP 10^2

1 ml

1 ml

9 ml BFP 10^3

1 ml

0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,4 ml BPA+ Egg yolk

0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,4 ml BPA+ Egg yolk

0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,3 ml BPA+ Egg yolk | 0,4 ml BPA+ Egg yolk

Inkubasi (35 ± 1) °C, 48 jam

Koloni terduga :
hitam, bulat, besar, ∅2-3 mm Licin Konvek

Inokulasi koloni terduga dari setiap cawan ke dalam 3 ml BHI Broth Inkubasi (35 ± 1) °C, 18 – 24 jam

Uji Koagulasi

Ambil 0,2-0,3 ml dari BHI ke tabung steril dan tambahkan 0,5 ml coagulase plasma dan EDTA

Inkubasi (35 ± 1) °C, Amati tabung tiap jam untuk 4 jam pertama s/d 24 jam

Negatif : koagulan tidak terbentuk
1 + Positif : koagulan tidak terkumpul, sedikit
2 + Positif : koagulan terkumpul pd bag. Atas dan sedikit
3 + Positif : koagulan terkumpul pd bag bawah dan banyak
4 + Positif : jika koagulan pada tabung dibalik tidak jatuh

Uji Tambahan dilakukan apabila pengkoagulan reaksi 2 + dan 3 +

Uji katalase

Inokulum dari BHI gores ke TSA, inkubasi 18 jam – 24 jam, (35 ± 1) °C

Ambil 1 loop inokulum.
Tambahkan 1 tetes, 3% H_2O_2

Fermentasi Glukosa / manitol

BHI, inkubasi 18 jam – 24 jam, (35 ± 1) °C

PBB + Glukosa 5% bagian atas lapisi dengan parafin oil inkubasi (35 ± 1) °C , selama 5 hari

PBB +Manitol 5% bagian atas lapisi dengan parafin oil inkubasi (35 ± 1) °C, selama 5 hari

Uji produksi nuclease thermostabil

BHI Broth yang telah di inkubasi (35 ± 1) °C, panaskan 100 °C 15 menit

Tuang 3 ml DNA agar setelah beku buat lubang Ø2 mm ambil 0,01 ml masukkan dalam lubang, inkubasi (35 ± 1) °C selama 4 jam

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

4 Penentuan *Staphylococcus aureus* dengan metode Angka Paling Memungkinkan (APM)

4.1 Prinsip

Metode APM menumbuhkan bakteri pada media cair dalam tabung reaksi. Menggunakan 3 tabung seri pengenceran setelah diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Tabung yang menunjukkan kekeruhan diinokulasi kedalam media *Baird Parker Agar*. Konfirmasi koloni terduga *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan uji koagulase dan uji tambahan. Metoda ini sesuai untuk pengujian rutin pada produk yang diduga mengandung jumlah *Staphylococcus aureus* dengan populasi rendah.

4.2 Peralatan

a) *Autoclave*;
b) Alat penghitung koloni;
c) Alat Timbang analitik dengan ketelitian ± 0,000 1;
d) Alat Timbang dengan ketelitian ± 0,1 g;
e) Botol pengencer 20 ml;
f) Blender beserta Jar yang dapat disterilisasi atau stomacher;
g) Cawan Petri 15 mm x 90 mm;
h) Gelas ukur 250 ml;
i) Gelas preparat;
j) Inkubator (35 ± 1) °C;
k) Membran aparatus;
l) Membran filter;
m) Pipet gelas atau pipetor 0,1 ml dan 1 ml;
n) Pipet pasteur;
o) Tabung reaksi;
p) *Waterbath*.

4.3 Media dan pereaksi (Lampiran B dan C)

a) *Baird Parker Agar* (B1);
b) *Brain Heart Infusion Broth* (B2);
c) *Coagulase Plasma* (*Rabbit*) dengan EDTA;
d) Larutan *Butterfield's phosphate buffered* (C 1);
e) *Purple Carbohydrate Broth* (masing-masing mengandung glucose dan manitol 0,5 %) (B 3);
f) *Parafin oil* steril;
g) Pereaksi katalase (3 % H_2O_2) (C 2);
h) Pereaksi pewarnaan gram (C 3);
i) *Toluidine Blue*- DNA Agar (B 4);
j) *Trypticase* (*Tryptic*) *Soy* Agar (B 5);
k) *Trypticase/tryptic soy broth* (TSB) mengandung 10 % NaCl dan 1 % sodium pyruvat (B6);

4.4 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknik aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau laminar air flow yang kontaminasinya terkontrol. Media *Baird Parker* Agar yang akan digunakan harus dalam keadaan kering. Bila koloni *Staphylococcus aureus* belum tumbuh dengan baik setelah 48 jam, inkubasi dapat dilanjutkan sampai 72 jam.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

4.5 Preparasi contoh

Berat contoh yang akan diuji diambil dengan ketentuan sebagai berikut:

4.5.1 Contoh dengan berat kurang dari 1 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil - kecil hingga beratnya mencapai 100 g.

4.5.2 Contoh dengan berat antara 1 kg – 4,5 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil - kecil hingga beratnya mencapai 300 g.

4.5.3 Contoh dengan berat lebih dari 4,5 kg

Secara aseptis, ambil contoh secara acak dan potong kecil - kecil hingga beratnya mencapai 500 g.

CATATAN 2 Contoh beku dilelehkan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C – 5 °C atau suhu dan waktu maksimal 45 °C dan 15 menit.

4.6 Prosedur

Timbang contoh secara aseptik sebanyak 25 g untuk contoh dengan ketentuan 4.5.1 dan 4.5.2 dan 50 g untuk contoh dengan ketentuan 4.5.3, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril. Untuk contoh 25 g tambahkan 225 ml larutan butterfield's phosphate buffered dan untuk contoh 50 g tambahkan 450 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*, homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^1. Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 ml homogenat di atas dan masukkan ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered* untuk mendapatkan pengenceran 10^2. Siapkan pengenceran selanjutnya (10^3) dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran 10^2 ke dalam 9 ml larutan *butterfield's phosphate buffered*. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^4, 10^5 dan seterusnya sesuai kondisi contoh.

4.6.1 Determinasi *Staphylococcus aureus*

a) Ambil 1 ml dari setiap pengenceran (10^1,10^2, dan seterusnya) dan inokulasikan ke dalam 3 seri tabung TSB yang mengandung 10 % NaCl dan 1 % *sodium piruvat*. Inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C selama (48 ± 2) jam.
b) Pilih tabung yang menunjukkan kekeruhan pada setiap pengenceran dan lakukan pengocokan kemudian goreskan sebanyak 1 jarum ose ke permukaan media *Baird Parker* Agar. Inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C selama (48 ± 2) jam.
c) Pada setiap cawan yang diduga mengandung *Staphylococcus aureus*, pindahkan sekurang-kurangnya 1 koloni dari setiap cawan ke BHI broth, inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C selama (24 ± 2) jam.
d) Koloni *Staphylococcus aureus* pada *Baird Parker Agar* mempunyai ciri - ciri: bundar, licin/halus, cembung, diameter 2 mm - 3 mm, warna abu - abu hingga kehitaman, sekeliling tepi koloni bening (terbentuk *halo*). Koloni - koloni mempunyai konsistensi berlemak dan lengket bila diambil dengan jarum inokulasi.

CATATAN 3 *Strains* yang berasal dari makanan beku atau makanan kering yang sudah lama disimpan, sering memberikan warna yang kurang hitam dibandingkan dengan koloni yang khas *Staphylococcus aureus*. Selain itu kenampakan koloni juga kasar dan teksturnya kering.

Lakukan identifikasi dan konfirmasi *Staphylococcus aureus* dengan uji koagulase dan uji tambahan

4.6.2 Uji koagulase

a) Dari BHI broth (4.6.1.c) pindahkan 0,2 ml - 0,3 ml inokulum tersebut ke dalam tabung steril dan tambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian aduk. Inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C. Amati tiap jam untuk 4 jam pertama dan lanjutkan hingga 24 jam untuk melihat terbentuknya koagulan.
b) Koagulan yang terbentuk secara padat/solid dan tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif (reaksi 4+) *Staphylococcus aureus*. Koagulan yang menunjukkan reaksi 2+ dan 3+ harus dilakukan uji tambahan. Tipe reaksi uji koagulase dapat dilihat pada gambar 1.

4.6.3 Uji tambahan

4.6.3.1 Uji katalase

a) Ambil 1 ose inokulum dari BHI broth (4.6.1.c), goreskan ke dalam media TSA miring dan inkubasi selama (18 – 24) jam pada suhu (35 ± 1) °C.
b) Setelah diinkubasi ambil 1 ose inokulum tersebut dan letakkan diatas gelas preparat, tetesi dengan H_2O_2 untuk melihat pembentukan gelembung-gelembung gas.

4.6.3.2 Fermentasi glukosa secara anaerob

a) Ambil 1 ose inokulum dari BHI broth (4.6.1.c) Inokulasikan ke tabung reaksi yang berisi media karbohidrat mengandung 0,5 % glukosa, tutup lapisan atas dengan *paraffin oil steril* setebal 25 mm.
b) Inkubasi selama 5 hari pada suhu (35 ± 1) °C. Kondisi asam dihasilkan secara anaerob jika terjadi perubahan warna media dari ungu menjadi kuning, ini menunjukkan adanya *Staphylococcus aureus*.

4.6.3.3 Fermentasi manitol secara anaerob

Lakukan seperti no. 4.6.3.2 di atas. Gunakan manitol sebagai karbohidrat dalam media. *Staphylococcus aureus* biasanya memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna dari ungu ke kuning, tetapi beberapa strain memberikan hasil negatif.

4.6.3.4 Uji produksi nuklease thermostabil

Uji produksi nuklease thermostabil tidak dapat menggantikan uji koagulase tetapi hanya digunakan untuk mendukung pengujian yang memberikan reaksi koagulase 2+. Pada uji ini terjadi perubahan warna dari biru menjadi merah muda cerah.

a) Tuang 3 ml *toluidine blue*–DNA agar diatas permukaan gelas preparat. Setelah media agar tersebut membeku, lubangi dengan diameter 2 mm.
b) Ambil 0,01 ml kultur BHI broth (4.6.1.c) yang telah dipanaskan dalam waterbath mendidih selama 15 menit pada suhu 100 °C.
c) Letakkan gelas preparat pada kondisi yang lembab dan inkubasi selama 4 jam pada suhu (35 ± 1) °C. Apabila terbentuk lingkaran berwarna merah muda cerah disekeliling lubang sekurang-kurangnya 1 mm, menunjukkan reaksi positif.

Karakteristik *Stapylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

4.6.4 Pelaporan *Staphylococcus aureus* dengan metode APM

Berdasarkan jumlah seri tabung positif dari setiap pengenceran yang memberikan reaksi spesifik *Staphylococcus aureus* pada uji koagulase atau uji tambahan, laporkan hasil *Staphylococcus aureus* dalam APM/g dengan mengggunakan tabel angka paling memungkinkan berdasarkan Lampiran A.

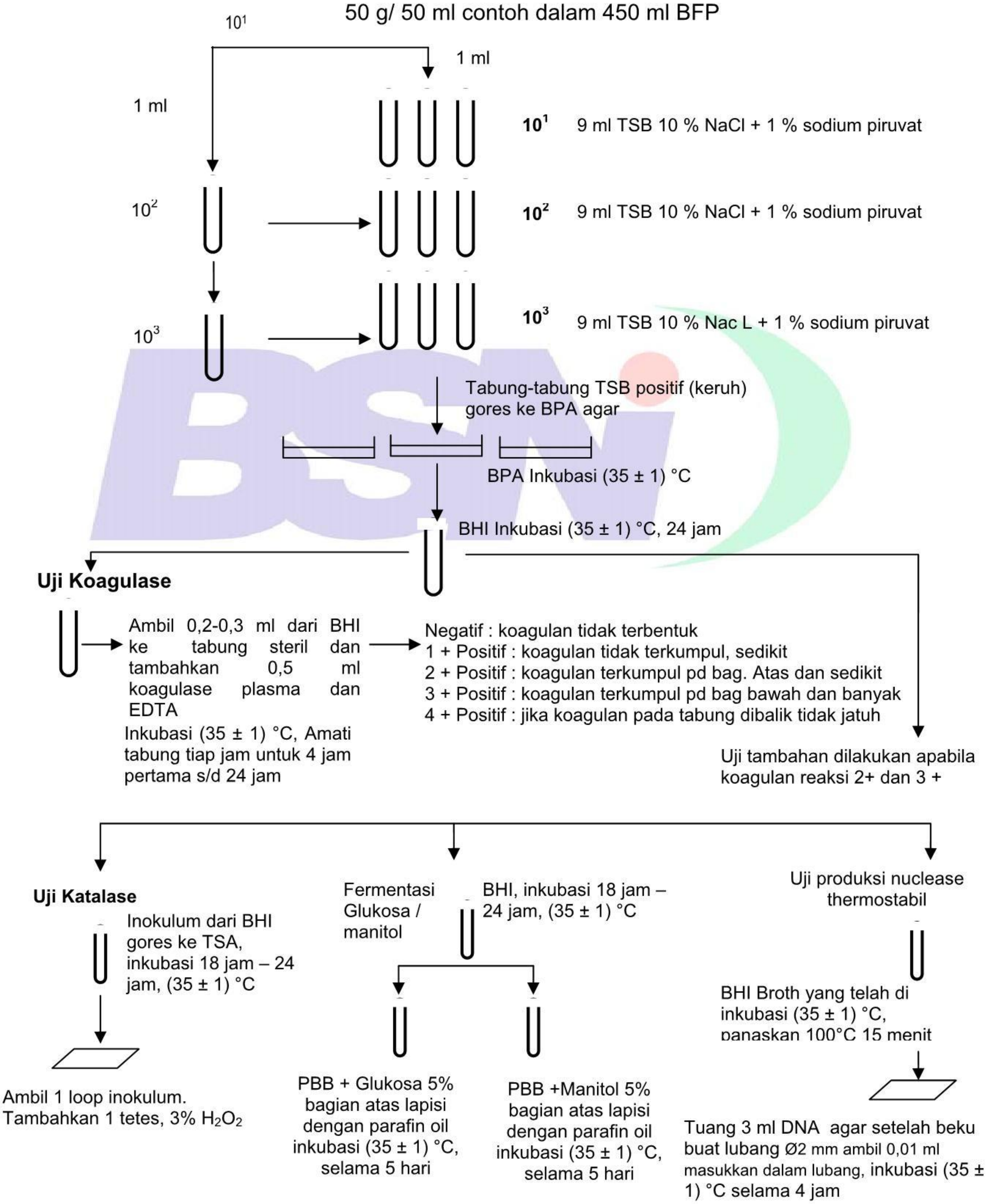
5 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisis maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- Gunakan jas lab selama melakukan analisis.
- Lakukan analisis di dalam laminar air flow.
- Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- Bersihkan segera contoh yang tumpah dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
- Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Skema Penentuan *Staphylococcus aureus* dengan Metode APM (Angka Paling Memungkinkan)



"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran A
(normatif)
Angka Paling Memungkinkan/APM dengan seri tabung pengenceran

A.1 Latar belakang

Metoda untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metoda hitungan mikroskopis, metoda hitungan cawan dan penentuan Angka Paling Memungkinkan (APM). Organisme yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metoda hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisma hidup yang dapat dihitung.

Metoda APM adalah metoda untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statisitik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut:

a) Bakteri dalam contoh menyebar secara random.
b) Bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau *cluster*, tetapi saling terpisah.
c) Organisma yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam media selama inkubasi
d) Kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan seperti media, suhu dan waktu inkubasi.

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika pada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh harus diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum yang dapat dihitung. Metoda pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 seri tabung pengenceran.

Metoda APM digunakan untuk menduga organisma dalam jumlah sedikit (kurang dari 100/ g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakurasian perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam Tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin, diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95 %. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh harus dilakukan pengujian kembali.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95 % untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^{1}, 10^{2} dan 10^{3}

Tabung positif			APM/ g	Tingkat kepercayaan		Tabung positif			APM/ g	Tingkat kepercayaan	
10^{1}	10^{2}	10^{3}		Bawah	Atas	10^{1}	10^{2}	10^{3}		bawah	atas
0	0	0	<3,0	-	9,5	2	2	0	21	4,5	42
0	0	1	3,0	0,15	9,6	2	2	1	28	8,7	94
0	1	0	3,0	0,15	11	2	2	2	35	8,7	94
0	1	1	6,1	1,2	18	2	3	0	29	8,7	94
0	2	0	6,2	1,2	18	2	3	1	36	8,7	94
0	3	0	9,4	3,6	38	3	0	0	23	4,6	94
1	0	0	3,6	0,17	18	3	0	1	38	8,7	110
1	0	1	7,2	1,3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3,6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7,4	1,3	20	3	1	1	74	17	200
1	1	1	11	3,6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3,6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4,5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4,5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9,2	1,4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3,6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4,5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3,7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4,5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8,7	94	3	3	3	>1100	420	--

Sumber: *Food and Drug Administration Bacteriological Analitycal Manual. 8th edition, 2001. Chapter 12. AOAC International.*

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

Lampiran B
(normatif)
Pembuatan media

B.1 *Baird Parker Agar*

Media Basal

Tryptone	10 g
Beef Extract	5 g
Yeast Extract	1 g
Sodium piruvat	10 g
Glicine	12 g
Lithium Chloride $6H_2O$	5 g
Agar	20 g

Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,0 ± 0,2). Jika langsung akan digunakan, dinginkan media suhu 48 °C – 50 °C sebelum penambahan media pengkayaan. Media dapat disimpan pada suhu (4 ± 1) °C selama 1 bulan dan lelehkan sebelum digunakan.

Media pengkayaan : *Bacto EY tellurite enrichment*.

Media kerja: Tambahkan 5 ml *Bacto EY tellurite enrichment* ke dalam 95 ml media basal yang telah dilelehkan 45 °C – 50 °C. Aduk hingga homogen (hindari gelembung), tuang sebanyak 10 ml – 15 ml ke dalam cawan Petri steril. Keringkan media sebelum digunakan.

B.2 *Brain heart Infusion broth* agar

Calf brain infusion	200 g
Beef heart infusion	250 g
Proteose peptone or gelysate	10 g
NaCl	5 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2,5 g
Dextrose	2 g
Aquades	1000 ml

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan-lahan. Masukkan ke dalam botol atau tabung untuk disimpan. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,4 ± 0,1). Untuk persiapan BHI Agar, tambahkan 15 g agar ke dalam 1000 mL BHI broth. Panaskan untuk melarutkan agar sebelum dimasukkan kedalam botol atau labu. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,2 ± 0,1).

B.3 *Purple Carbohydrate Broth*

Proteose peptone No. 3	10 g
Beef extract	1 g
NaCl	5 g
Bromcresol Purple	0,02 g
Aquades	1000 ml

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Karbohidrat *

* Siapkan *glukosa* dan *manitol* stock masing-masing 5 % dengan menimbang 5 g glukosa dalam 100 ml aquades dan 5 g manitol dalam 100 ml aquades. Homogenkan dan steril dengan membran filter. Tambahkan 0,5 ml larutan stock *glucose* 5 % kedalam 4,5 ml media basal *Purple Broth Base* dan 0,5 ml larutan stock *manitol* 5 % kedalam 4,5 ml media basal *Purple Broth Base* untuk menghasilkan 0,5 % larutan karbohidrat.

B.4 *Toluidine Blue*- DNA Agar

Dioxyribonucleic Acid (DNA)	0,3 g
Agar	10 g
$CaCl_2$ (*anhydrous*)	1,1 mg
NaCl	10 g
Toluidine blue O	0,083 g
Tris (hidroxymethyl) aminomethane	6,1 g
Aquades	1000 ml

Larutkan *tris Aminomethane* dalam 1 liter aquades. Atur pH menjadi 9,0. Tambahkan bahan-bahan lainnya kecuali *Toluidine blue O* dan panaskan hingga mendidih. Larutkan *Toluidine blue O* dalam media tersebut dan masukkan ke dalam labu bertutup karet. Sterilisasi tidak diperlukan jika media langsung digunakan. Media steril stabil pada temperatur ruang selama 4 bulan.

B.5 *Trypticase (tryptic) Soy* Agar

Trypticase peptone	15 g
Tryptone peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aquades	1000 ml

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2).

B.6 *Trypticase* (*tryptic*) *soy broth with* 10% NaCl dan 1% *sodium piruvat*

Trypticase atau *tryptose (pancreatic digest of casein)*	17 g
Phytone (papaic digest of soya meal)	3 g
NaCl	100 g
KH_2PO_4	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Sodium piruvat	10 g
Aquades	1000 ml

Larutkan *trypticase* atau *tryptose soy broth* dengan 95 g NaCl dan 10 g *sodium piruvat* dalam 1 liter aquades. Atur pH akhir 7,3. Panaskan jika perlu. Tuang 10 ml ke dalam tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm. *Autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2). simpan tidak lebih dari 1 bulan pada suhu (4 ± 1) °C.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran C
(normatif)
Pembuatan pereaksi

C.1 Larutan *Butterfield's phosphate buffered*

Larutan stok

KH_2PO_4	34 g
Aquades	500 ml

Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 000 ml dengan penambahan aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan dalam refrigerator.

Larutan kerja

Pipet 10 ml larutan stok dan tepatkan hingga 1 000 ml dengan penambahan aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

C.2 Uji katalase

Tetesi kultur agar miring dengan 3 % H_2O_2 terbentuknya gelembung menunjukkan uji positip. Cara lain, emulsikan kultur di atas gelas preparat dan tetesi dengan 3 % H_2O_2.

C.3 Pereaksi pewarnaan Gram

Hucker's crystal violet

Larutan A

Crystal violet	2 g
Ethyl alcohol, 95 %	20 ml

Larutan B

Ammonium oxalat	0,8 g
Aquades	80 ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring.

Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Aquades	300 ml

Masukkan KI dalam mortar, tambahkan iodine dan gerus dengan alat penggiling selama 5 detik - 10 detik. Tambahkan 1 ml air dan gerus kemudian tambahkan 5 ml air. Tambahkan lagi 10 ml dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol reagen. Bilas mortar dan alat penggerusnya dan tambahkan air hingga volume 300 ml.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Hucker's Counterstain **(larutan stok)**

Safranin O	2,5 g
Ethanol, 95 %	100 ml

Larutan stock :
larutkan *Safranin O 2,5 g* kedalam *Ethanol* 95 % 100 ml

Larutan kerja:
larutkan 10 ml larutan stok ke dalam 90 ml aquades

Prosedur pewarnaan :

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahakan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewatkan melalui api burner. Warnai film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan gram's *iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *ethanol* 95 % hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *Hucker's counterstain* (safranin) selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa dibawah mikroskop.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliogafi

Australian Standard. AS 1766.2.4. – 1994. Method 2.4: Examination for spesific organisms-Coagulase-positive staphylococci.

Food and Drug Administration Bacteriological Analitycal Manual. 8th edition, 2001. Chapter 12. AOAC International.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

“Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2011

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id

© BSN 2011